

文章编号: 1674-8085(2021)01-0043-06

# 靶向重组 Aif-T18 融合蛋白对 TEM1 阳性肿瘤细胞的杀伤作用的研究

邓侃<sup>1</sup>, 陈廷涛<sup>2</sup>, \*彭颖征<sup>3</sup>

(1.吉安职业技术学院, 江西, 吉安 343000; 2.南昌大学转化医学研究院, 江西, 南昌 330031; 3.厦门大学附属第一医院病理科, 福建, 厦门 361003)

**摘要:** 验证 Aif-T18 融合蛋白对肿瘤内皮细胞标志分子 1 (TEM1) 阳性肿瘤细胞的杀伤作用。采用基因工程技术方法构建重组质粒 pIRES-TEM1-EGFP, 转染 TEM1 阴性表达细胞 MS1, 经 G418 筛选得到 TEM1 阳性细胞株 (MS1-TEM1); 通过构建重组质粒 pET302-Aif 和 pET302-Aif-T18, 转化至表达宿主菌 BL21 中, 经异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 诱导菌体得到所需的蛋白, 采用流式细胞仪和 MTT 技术检测融合蛋白对 MS1 和 MS1-TEM1 细胞的亲和力和特异性杀伤的效果。本研究中, 主要利用单链抗体 scFvT18 选择性携带凋亡诱导因子 AIF, 靶向抑杀 TEM1 阳性细胞, 从而为 Aif-T18 融合蛋白在肿瘤治疗中的开发应用提供实验依据。

**关键词:** TEM1; 单链抗体; Aif

中图分类号: R73-3

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2021.01.008

## EVALUATION OF KILLING EFFECT OF AIF-T18 FUSION PROTEIN ON TEM1 POSITIVE CANCER CELLS

DENG Kan<sup>1</sup>, CHEN Ting-tao<sup>2</sup>, \*PENG Ying-zheng<sup>3</sup>

(1. Vocational College of Ji'an, Ji'an, Jiangxi 343000, China;

2. Institute of Translational Medicine, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330031, China;

3. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361003, China)

**Abstract:** To verify the killing effect of Aif-T18 fusion protein on tumor endothelial cell marker molecule 1 (TEM1) positive tumor cells, genetic engineering technology was used to construct the recombinant plasmid pIRES-TEM1-EGFP, transfected with TEM1-negative expression cell MS1, and screened by G418 to obtain TEM1-positive cell lines (MS1-TEM1). The recombinant plasmids pET302-Aif and pET302-Aif-T18, transformed into the expression host strain BL21, and the target protein was induced by bacterial cells induced by isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). The affinity and specific killing effect of the fusion protein on MS1 and MS1-TEM1 cells were detected by flow cytometry and MTT. In this study, the single-chain antibody scFvT18 was used to carry the apoptosis-inducing factor AIF selectively and target and suppress TEM1-positive cells, thereby providing an experimental basis for the development and application of Aif-T18 fusion protein in tumor therapy.

**Key words:** TEM1; single chain antibody; Aif

近年来, 恶性肿瘤的发病率逐渐增高, 严重威胁着人们的生命安全和健康<sup>[1]</sup>。由于肿瘤细胞的异

收稿日期: 2020-10-22; 修改日期: 2020-12-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360377); 江西省教育厅青年科学基金项目(GJJ14197, GJJ14218)

作者简介: 邓侃(1990-), 男, 江西吉安人, 助教, 硕士, 主要从事单克隆抗体研究(E-mail: dengkan199006@126.com);

陈廷涛(1984-), 男, 江西南昌人, 副教授, 博士, 主要从事微生物研究(E-mail: 695237096@qq.com);

\*彭颖征(1989-), 男, 江西樟树人, 技师, 主要从事分子病理研究(E-mail: 1067716910@qq.com).

质性和遗传不稳定性等特点<sup>[2]</sup>,对于肿瘤的治疗难以达到预期的效果<sup>[3-4]</sup>。此外,肿瘤微环境包括肿瘤新生血管、血管周细胞、基质和间质细胞等为肿瘤细胞提供了生存和生长所需的营养及浸润途径,它能使肿瘤细胞逃避机体免疫系统的识别和抗原提呈,从而增加了机体杀伤肿瘤的难度。然而,与肿瘤细胞相比,这些构成肿瘤微环境的细胞具有遗传性质稳定和较低的突变率,又不同于其他正常组织细胞,它们是理想的肿瘤靶向目标。

最新的研究表明,TEM1可以在几乎所有实体瘤相关细胞中大量表达<sup>[5-6]</sup>,但在正常细胞中不表达或者表达水平极低<sup>[7-8]</sup>,它是一种理想的肿瘤靶向基因<sup>[9-10]</sup>。因此,本研究拟使用在前期研究中经酵母抗体库筛选分离获得可以同时结合人类与鼠类TEM1的高亲和力、特异性单链抗体(scFvT18),并携带全人源化生物毒素(如人源化毒素AIF),最终通过靶向杀伤TEM1阳性细胞达到抑杀肿瘤细胞的效果<sup>[11]</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

pCMV6-XL4 载体、pGEM-3ZF(-)载体、pIRES-EGFP 载体、pET302 载体、MS1 细胞株等由本实验室保存;重组质粒 pET302-Aif-T18 与 pET302-Aif 在南昌大学转化医学研究院实验室完成构建和实验。

### 1.2 试剂

T4 DNA 连接酶、10 kb plus DNA ladder 购自日本 TaKaRa 公司;限制性内切酶 *EcoRI*HF 和 *XbaI* 购自美国 NEB 公司。Gel Extraction Kit、Plasmid Mini Kit I 购自美国 OMEGA 公司;胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;G418 购自美国 Invitrogen 公司;一抗(兔 His-Tag 抗体)、二抗(鼠抗兔抗体)、台盼蓝、氨苄霉素(Amp)购自美国 Sigma 公司。

### 1.3 实验仪器

CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司);倒置荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司);Biofuge Stratos 台式高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司);LEGEND Micro21R 微量台式离心机(美国 Thermo 公司);PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);SW-CJ-2FD 型超净化工作台(苏州净化设备有限公司);流式细胞仪

(德国 MerckMillipore 公司);DYY-2C 琼脂糖凝胶电泳系统(北京六一仪器厂);WD-9403C 型紫外分析仪(北京市六一仪器厂)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 TEM1 阳性肿瘤细胞系构建

pCMV6-XL4 和 pGEM® -3Zf(-)分别用 1 μL *ECORI*-HF 与 1 μL *XbaI* 双酶切,50 μL 总体系。酶切产物回收后电泳,将目的 DNA 进行回,酶连得到重组质粒 pGEM® -3Zf(-)-TEM1,将其转化至 top10 后质粒提取,用 *ECORI*-HF、*PstI*-HF 酶切 pGEM® -3Zf(-)-TEM1 与 pIRES-EGFP,成功地构建了 pIRES-TEM1-EGFP 重组质粒。

从液氮迅速取出 MS1 细胞,置于 37℃ 水浴,快速摇动,电转 pIRES-TEM1-EGFP 至 MS1 细胞,电压设置为 1.8 KV,细胞在 G418 (100 mg/mL)的培养基中培养,用荧光显微镜观察其荧光表达,将这些细胞消化,以每孔 100 μL 加至 96 孔板生长,每 3~4 d 更换含 G418 培养基,密切关注细胞生长情况。当视野下 70%~80%占据荧光细胞时,将其更换至 24 孔板进一步培养。用 10% DMSO 胎牛血清的将细胞低温保存于液氮罐。

### 1.2.2 Aif-T18 融合蛋白的表达及纯化

IPTG 诱导 pET302-Aif-T18 和 pET302-Aif 单克隆菌体获得包涵体,洗涤后,加至 8M 尿素溶解,终浓度 30~50 mg/mL,室温下旋转 4 h,13000 rpm 离心 30 min,缓慢加入 2M 尿素,混匀,置于 4℃ 条件下复性 36~48 h 后,离心,转速 8000 rpm,与 His beads 按 1:4 混合,置于 4℃ 旋转仪,4 h 后,加入 500 mM 的咪唑洗脱蛋白,洗脱蛋白经 PBS 透析,Western Blot 鉴定,一抗用封闭液按 1:1000 的比例稀释后在 4℃ 摇床中缓慢摇动过夜进行回收。加 TBS-T 洗涤液,重复 3 次,时间 15 min。二抗与封闭液按 1:2500 浓度稀释加入 TBS-T 洗涤液,重复 3 次,时间 15 min。置于凝胶成像仪,显色。

### 1.2.3 重组 Aif-T18 融合蛋白对 TEM1 阳性肿瘤细胞的结合

吸出细胞上清,细胞用 DHanks 溶液冲洗,重复两遍,吸尽 DHanks,加 5 mL 细胞培养液,置于细胞培养箱,吸出培养液,PBS 洗涤 2 次,加 10 mL versene 溶液,放置约 10~30 min,直至细胞变圆,用吸管吹打从而分离细胞,添加 9 mL 培养基(10%FBS)和等分试样的细胞成 14 管(1 mL/管)

标记 MS1 14 管和 MS1-TEM1 14 管,离心,1200 rpm, 4 °C, 5 min, 将上清缓慢小心地吸出,加入 100  $\mu$ L 培养基 (10%FBS), 冰上孵育 30 min, 洗涤 3 次, 100  $\mu$ L 培养基重悬, 添加抗 His-Ab -APC, 在冰上孵育 30 min, 如前面方法洗涤 3 次, 300  $\mu$ L FACS 缓冲液悬浮细胞用, 转移细胞进入 FACS 管用于 FACS 分析。

### 1.2.4 重组 Aif-T18 融合蛋白对 TEM1 阳性肿瘤细胞的杀伤效果

在显微镜下观察细胞生长状态, 若细胞处于对数期, 则进行细胞消化, 以  $5 \times 10^4$ /mL 浓度接种于 4 块 96 孔板, (MS1 细胞和 MS1-TEM1 细胞各两块), 每孔 200  $\mu$ L。于 5% CO<sub>2</sub>、37°C 培养, 每天间隔 3~6 h 光镜下观察加药 (1 $\mu$ M) 后 MS1 细胞和 MS1-TEM1 细胞细胞的凋亡情况, 待发现有明显细胞皱缩甚至细胞小碎片出现后, 终止培养, 利用 MTT 法评价其细胞活性。

### 1.2.5 数据处理

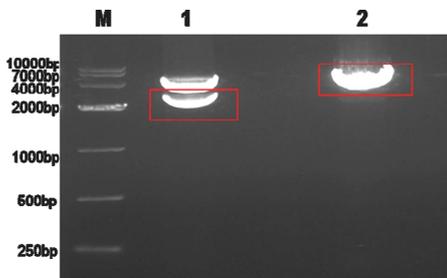
数据均采用平均数 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示, 用 SPSS 13.0 软件分析, 采用 Student-t 检验分析不同实验组间差异,  $P < 0.05$  表示有统计学差异,  $P < 0.01$  表示统计学显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 TEM1 阳性肿瘤细胞系构建

#### 2.1.1 pCMV6-XL4 与 pGEM® -3Zf(-)酶切鉴定

从商品化的、包含 TEM1 全长序列的 pCMV6-XL4(购自 ORIGENE 公司)利用 *EcoR I-HF* 和 *XbaI* 双酶切得到大约 2600 bp 的 TEM1 序列(条带 1), 并将其装入到同样经 *EcoR I-HF* 和 *XbaI* 双酶切的 pGEM® -3Zf(-)质粒。



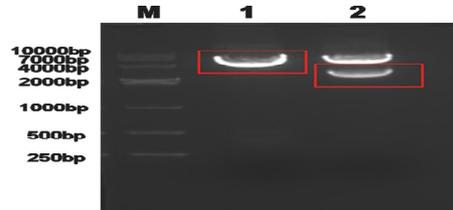
M: DL10000, 1: 酶切后的 pCMV6-XL4, 2: 酶切后的 pGEM® -3Zf(-)

图 1 pCMV6-XL4 与 pGEM® -3Zf(-)酶切结果

Fig.1 pCMV6-XL4 and pGEM® -3Zf(-) double digestion results

#### 2.1.2 pGEM-3ZF-TEM1 与 PIRES-EGFP 酶切结果

重组质粒 pGEM® -3Zf(-)-TEM1 与质粒 pIRES-EGFP 分别经 *EcoR I-HF* 与 *Pst I-HF* 酶切, 电泳后分别获得 5200 bp (泳道 1) 和 2600 bp (泳道 2) 左右的目的条带(图 2), 测得浓度分别是 38.9、42.1 ng/ $\mu$ L。



M: DL10000, 1: 酶切 pGEM® -3Zf(-)-TEM1, 2: 酶切 pIRES-EGFP

图 2 pGEM® -3Zf(-)-TEM1 和 pIRES-EGFP 酶切结果  
Fig.2 pGEM® -3Zf(-)-TEM1 and pIRES-EGFP double digestion results

#### 2.1.3 MS1-TEM1 稳定细胞系的构建

重组质粒 pIRES-TEM1-EGFP 电转入 MS1 细胞。培养 24 h, 荧光显微镜下 100 倍与 200 倍视野观察具有荧光表达, 细胞在白光下生长良好, 表明转染成功, 利用 G418 筛选获得 MS1-TEM1 稳定细胞系。

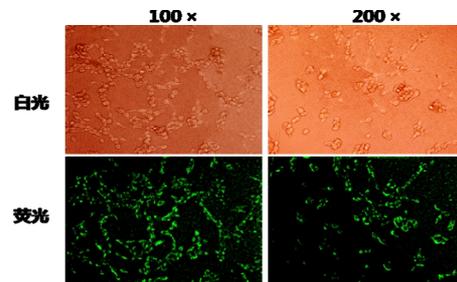
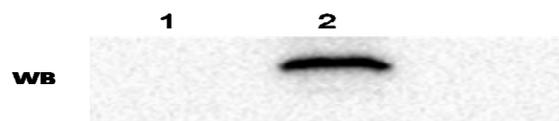


图 3 荧光显微镜 TEM1 阳性细胞转染及验证

Fig.3 Transfection and verification of TEM1 positive cells under a fluorescence microscope

#### 2.1.4 重组质粒转染 MS1 与 MS1-TEM1 细胞验证

将重组质粒 pIRES-TEM1-EGFP 分别转染 MS1 与 MS1-TEM1, Western Blot 验证 TEM1 阳性细胞具有目的蛋白 TEM1 表达, 表明成功构建了 MS1-TEM1 细胞系 (图 4)。



1: MS1 阴性对照 2: MS1-TEM1

图 4 重组质粒转染 TEM1 阳性细胞 Western Blot 验证蛋白表达

Fig. 4 Western Blot verified protein expression after transfection of pIRES-TEM1-EGFP into TEM1-positive cells

## 2.2 Aif-T18 融合蛋白以及 Aif 蛋白表达与纯化

将重组质粒 pET302-Aif-T18 以及 pET302-Aif 转化 *BL21* 感受态细胞, 过夜活化, 次日加入 200 mL LB 培养液, 37°C, 加 IPTG 诱导 4 h, 超声破碎获得包涵体, 经变性、复性得到可溶性活性蛋白。如

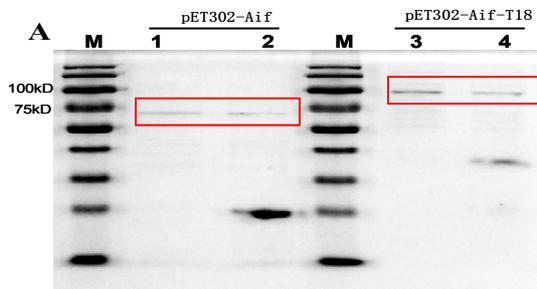
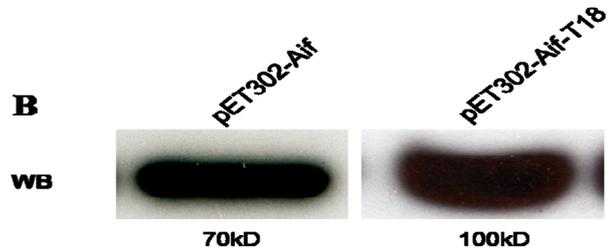


图 A : M: Marker, 1: 纯化 Aif, 2: 未纯化 Aif, 3: 纯化 Aif-T18, 4: 未纯化 Aif-T18。图 B: Western Blot。一抗: His 抗体 二抗: 羊抗鼠-HRP

图 5 重组蛋白 SDS-PAGE 及 WesternBlot 验证

Fig. 5 Recombinant proteins SDS-PAGE and WesternBlot verification

图 6A 和 6B 所示, pET302-Aif 约为 70 kDa, pET302-Aif-T18 约为 100 kDa。而后纯化蛋白。获得纯度 95% 的 Aif-T18 (条带 3) 与 Aif (条带 1) 如图 5A 所示, Western-Blot 结果证实为目的蛋白如图 5B 所示。



## 2.3 Aif-T18 融合蛋白以及 Aif 蛋白对细胞的结合

将 Aif-T18 与 MS1、MS1-TEM1 细胞共同培养, 通过流式细胞仪检测目的蛋白与 MS1-TEM1 的结合能力。图 6A 表明 Aif-T18 与 Aif 对 TEM1 对 MS1 细胞没有结合能力; 图 6B 表明 Aif 对 MS1-TEM1

细胞没有结合能力, 但融合蛋白 Aif-T18 能较强的与 MS1-TEM1 结合, 说明融合蛋白 Aif-T18 与 MS1-TEM1 细胞具有良好的特异性以及较强的结合能力。

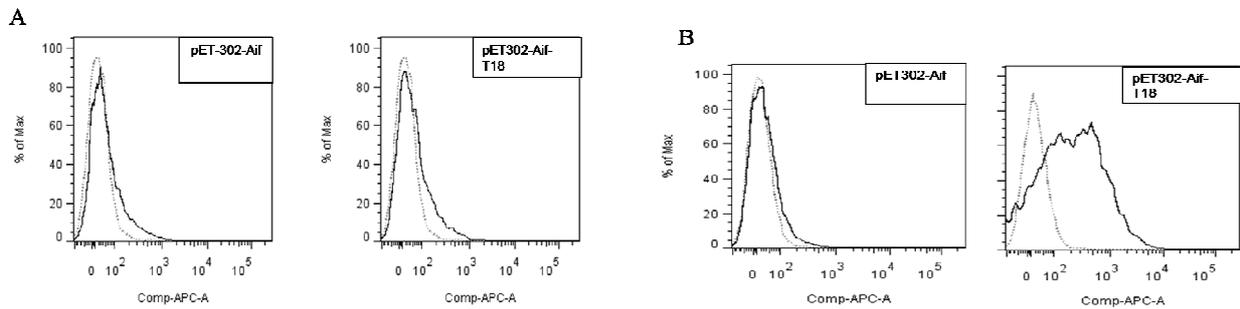


图 A: Aif-T18, Aif 对 MS1 的结合能力, 图 B: Aif-T18, Aif 对 MS1-TEM1 的结合能力

图 6 融合蛋白与细胞的结合能力

Fig.6 Binding ability of fusion protein and cells

## 2.4 重组 Aif-T18 融合蛋白对 TEM1 阳性肿瘤细胞的杀伤效果

为进一步验证 Aif-T18 以及 Aif 对 MS1 与 MS1-TEM1 的杀伤能力。图 7A 和图 7B 显示, 培养 24 h, 1  $\mu$ M 的 Aif-T18 和 Aif 对 MS1 与 MS1-TEM1 基本没有杀伤作用; 此后, 每天间隔 3~6 h 在光镜观察细胞形态出现显著皱缩甚至小碎片, 终

止培养, MTT 评价细胞活性。如图 7C 和 7D, 72 h, Aif-T18 与 Aif 都可明显杀伤 MS1 ( $P < 0.01$ ) 与 MS1-TEM1。在 MS1 组, Aif-T18 和 Aif 杀伤效果没有明显差别, 而在 MS1-TEM1 组, Aif-T18 对细胞杀伤作用明显高于 Aif, 表示 AIF 在体外杀伤效果明显, 但融合蛋白的靶向作用效果显著高于 AIF 的细胞凋亡诱导率。

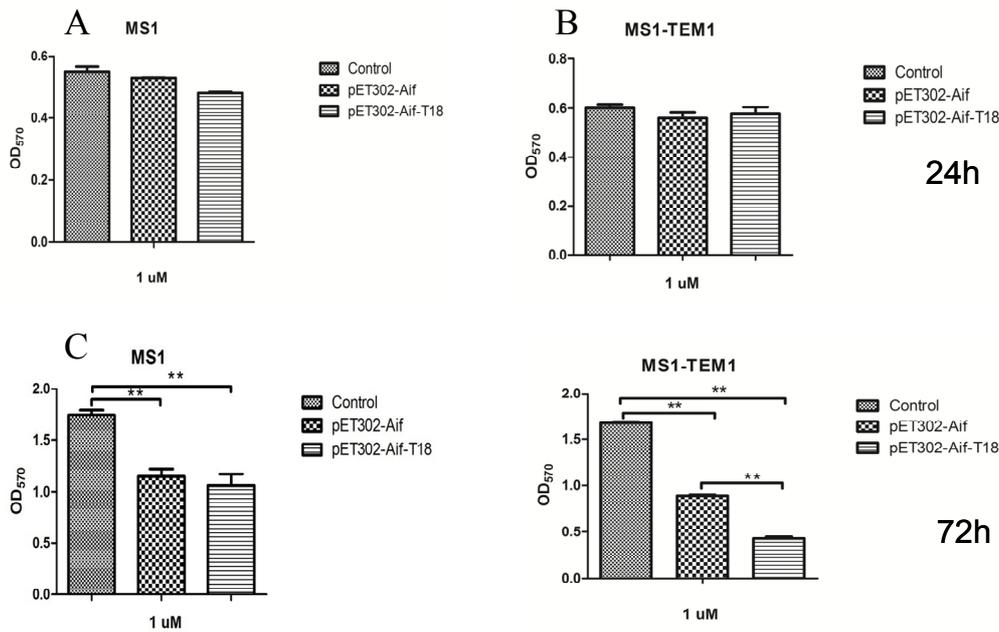


图 A 和 B: 24 h 后 Aif, Aif-T18 对 MS1 与 MS1-TEM1 细胞的杀伤作用, 图 C 和 D: 72 h 后 Aif, Aif-T18 对 MS1 与 MS1-TEM1 细胞的杀伤作用 (\*\*:  $P < 0.01$ )

图 7 MTT 结果  
Fig.7 MTT results

### 3 讨论

TEM1 是一种细胞膜蛋白, 主要在肿瘤内皮细胞以及部分肿瘤细胞中表达<sup>[12]</sup>, 因此可用于肿瘤靶向治疗。利用酵母菌展示技术, 从人外周血细胞分离到单链抗体 T18, 且证明其能与 TEM1 蛋白高度结合<sup>[13-14]</sup>。因而利用 T18 携带的治疗性物人源化毒素 AIF, 可特异性地靶向遗传性状稳定的肿瘤细胞微环境。

TEM1 用于肿瘤治疗的靶点具有重要意义。(1) TEM1 主要与细胞外基质中的纤维连接蛋白、I 型胶原、IV 型胶原相互作用, 加速外周细胞的增殖, 使其分泌能够降解血管外基质蛋白酶, 有助于内皮细胞的迁移<sup>[15]</sup>。(2) 在正常组织中血管生成基本不出现, 因而靶向血管生成只针对肿瘤组织细胞, 不会对正常组织细胞产生严重副作用<sup>[16]</sup>。(3) 临床已经证明肿瘤的抗血管生成治疗具有良好的疗效和广谱的抗肿瘤作用<sup>[17]</sup>。

本研究中将人源化毒素(AIF)与单链抗体 T18 融合表达, 结果表明重组蛋白 AIF-T18 能与 TEM1 阳性细胞系 (MS1-TEM1) 特异性地结合并对该细胞具有显著杀伤作用。此外, 由于 TEM1 在实体瘤细

胞中有特异性表达<sup>[18-19]</sup>, 因此, T18 和毒素 AIF 的构建可以发挥更为特异的抗肿瘤作用, 为肿瘤的治疗提供新的方向和思路。下一步将验证融合蛋白在人体内的作用效果。

#### 参考文献:

- [1] 杨潮,何小杨,莫淑芳,等. 人WDR79基因启动子表达载体的构建及鉴定[J]. 井冈山大学学报:自然科学版,2019,40(3):31-34+55.
- [2] 刘志强,王博龙. 基于TCMSP抗肿瘤中药小分子EGFR-TKI的研究[J].井冈山大学学报:自然科学版,2018,39(2):87-92.
- [3] Yang H, Fang L, Zhan R, et al. Polo-like kinase 2 regulates angiogenic sprouting and blood vessel development [J]. Dev Biol, 2015, 404(2): 49-60.
- [4] Ferrara N, Kerbel R S. Angiogenesis as a therapeutic target [J]. Nature, 2005, 438(7070): 967-74.
- [5] Pietrzyk L. Biomarkers discovery for colorectal cancer: a review on tumor endothelial markers as perspective candidates[J]. Disease markers, 2016, 2016.
- [6] Rak J, Al-Nedawi K, Meehan B, et al. Tumor cell-derived microvesicles: U.S.Patent 9,186,405[P]. 2015-11-17.
- [7] Opavsky R, Haviernik P, Jurkovicova D, et al. Molecular

- Characterization of the MouseTem1/endosialin Gene Regulated by Cell Density in Vitro and Expressed in Normal Tissues in Vivo[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(42): 38795-38807.
- [8] Teicher B A. CD248: A therapeutic target in cancer and fibrotic diseases[J]. *Oncotarget*, 2019,10(9): 993.
- [9] O'leary A P, Fox J M, Pullar C E. Beta-Adrenoceptor Activation Reduces Both Dermal Microvascular Endothelial Cell Migration via a cAMP-Dependent Mechanism and Wound Angiogenesis [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(2): 356-65.
- [10] Fagiani E, Loentz P, Bill R, et al. VEGF receptor-2-specific signaling mediated by VEGF-E induces hemangioma-like lesions in normal and in malignant tissue [J]. *Angiogenesis*, 2016(35):1-20.
- [11] 邓侃. Aif-T18融合蛋白对TEM1阳性细胞的体外杀伤效果评价[D].南昌:南昌大学,2016.
- [12] Santoro S. T cells bearing a chimeric antigen receptor against the tumor vasculature destroy the tumor endothelium and result in tumor regression [J]. *J cell physiol*,2014,
- [13] Yuan X, Chen X, Yang M, et al. Efficient construct of a large and functional scFv yeast display library derived from the ascites B cells of ovarian cancer patients by three-fragment transformation-associated recombination[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2016, 100(9): 4051-4061.
- [14] Yuan X, Yang M, Chen X, et al. Characterization of the first fully human anti-TEM1 scFv in models of solid tumor imaging and immunotoxin-based therapy[J]. *Cancer immunology, immunotherapy*, 2017, 66(3): 367-378.
- [15] Hong Y K, Lee Y C, Cheng T L, et al. Tumor Endothelial Marker 1 (TEM) Enhances Wound Healing by Interacting with Platelet-Derived Growth Factor Receptors[J]. *Journal of Investigative Dermatology*,2019, 139(10): 2204-2214.
- [16] Shen J, Xiao Z, Zhao Q, et al. Anti - cancer therapy with TNF  $\alpha$  and IFN  $\gamma$ : A comprehensive review[J]. *Cell proliferation*, 2018, 51(4): e12441.
- [17] Abdalla A M E, Xiao L, Ullah M W, et al. Current challenges of cancer anti-angiogenic therapy and the promise of nanotherapeutics[J]. *Theranostics*, 2018, 8(2): 533.
- [18] Yuan X, Yang M, Chen X, et al. Correction to: Characterization of the first fully human anti-TEM1scFv in models of solid tumor imaging and immunotoxin-based therapy[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2018, 67(2): 329-339.
- [19] Wang Z, Tang Y, Tan Y, et al. Cancer-associated fibroblasts in radiotherapy: challenges and new opportunities[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2019, 17(1): 47.